

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平11-508357

(43)公表日 平成11年(1999)7月21日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	D
C 0 7 K 14/195		C 0 7 K 14/195	
14/405		14/405	
14/705		14/705	
16/18		16/18	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 24 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願平9-502695	(71)出願人	セ ア エス バイオ アンテルナシオ ナル
(86) (22)出願日	平成8年(1996)6月7日		フランス 91400 サクレイ エール エ ン 306
(85)翻訳文提出日	平成9年(1997)12月8日	(72)発明者	マチ ジェラルール
(86)国際出願番号	PCT/FR96/00865		フランス 30200 バニユール シー セ ーズ アンバス ドゥ ラ カブレ デ ラドゥレ 17
(87)国際公開番号	WO96/42016	(74)代理人	弁理士 神原 貞昭
(87)国際公開日	平成8年(1996)12月27日		
(31)優先権主張番号	95/06821		
(32)優先日	1995年6月9日		
(33)優先権主張国	フランス (FR)		
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L U, MC, NL, PT, SE), JP, US		

(54)【発明の名称】 フィコピリン蛋白質-結合ペプチド錯体の蛍光トレーサとしての利用方法

(57)【要約】

測定媒質中に存在する可能性がある被検体を蛍光を利用して検出および/または定量するにあたり、フィコピリン蛋白質-結合ペプチド錯体を蛍光トレーサとして使用するフィコピリン蛋白質-結合ペプチド錯体の利用方法について記載されている。また、配位体と受容体との特定結合対の一方と共有結合したフィコピリン蛋白質-結合ペプチド錯体により形成されたことを特徴とする蛍光共役結合体についても記載されている。

【特許請求の範囲】

1. フィコビルン蛋白質-結合ペプチド錯体を蛍光トレーサとして使用するフィコビルン蛋白質-結合ペプチド錯体の蛍光トレーサとしての利用方法。
2. 測定媒質中に存在する可能性がある被検体を蛍光を利用して検出および/または定量するにあたり、フィコビルン蛋白質-結合ペプチド錯体を蛍光トレーサとして使用することを特徴とするフィコビルン蛋白質-結合ペプチド錯体の蛍光トレーサとしての利用方法。
3. フィコビルン蛋白質が、フィコエリトリン、フィコエリトロシアニン、フィコシアニン、アロフィコシアニン及びアロフィコシアニンBから選択されることを特徴とする請求項1もしくは2記載のフィコビルン蛋白質-結合ペプチド錯体の蛍光トレーサとしての利用方法。
4. フィコビルン蛋白質-結合ペプチド錯体が、*Mastigocladus Laminosus*, *Synechocystis 6701*, *Synechococcus 6301*, *Anabaena variabilis* and *Nostoc spec.* から選択されたラン藻類から抽出されることを特徴とする請求項1, 2もしくは3記載のフィコビルン蛋白質-結合ペプチド錯体の蛍光トレーサとしての利用方法。
5. 結合ペプチドが、ペプチド LR, LC, LRC 及び LCM から選択されることを特徴とする請求項1から請求項4までのいずれかに記載のフィコビルン蛋白質-結合ペプチド錯体の蛍光トレーサとしての利用方法。
6. フィコビルン蛋白質-結合ペプチド錯体が、錯体:
(α PEC, β PEC), LR, (α PEC, β PEC), LR, (α PC, β PC), LR, (α PC, β PC), LRC, (α PC, β PC), LR, (α AP, β AP), LC, (α APB, α_2 AP, β_3 AP) LC 及び (α AP, β AP), LCM から選択されることを特徴とする請求項1から請求項5までのいずれかに記載のフィコビルン蛋白質-結合ペプチド錯体の蛍光トレーサとしての利用方法。
7. 被検体に対する少なくとも一つの受容体から成る第1の試薬を媒質中に添加する第1のステップと、上記被検体もしくは上記被検体に対する少なくとも一つの受容体のうちから選択された第2の試薬を添加する第2のステップとを、

上記第1及び第2の試薬のうち的一方が、希土類クリプテート、キレートもしくは巨大環状錯体から成る蛍光供与体化合物と結合しており、また、上記第1及び第2の試薬のうち他方が、蛍光受容体化合物と結合しているもとで、上記第1のステップと上記第2のステップとの順序については可逆としてとり、

さらに、上記第1及び第2の試薬が添加された媒質を、上記蛍光供与体化合物についての励起波長を有した光によって励起した後、

上記蛍光受容体化合物が発する信号を測定するステップをとり、

上記蛍光受容体化合物としてフィコビルン蛋白質-結合ペプチド錯体を使用することを特徴とする、

媒質中に存在する可能性がある被検体を、該被検体と少なくとも一つの対応受容体との間の反応による生成物を表示することによって検出および／または定量する均質蛍光検出／定量方法。

8. 被検体が含まれていることが分かっている媒質中に、上記被検体に対する少なくとも一つの受容体であって、希土類クリプテート、キレートもしくは巨大環状錯体により形成された蛍光供与体化合物と結合しているものから成る第1の試薬を添加するステップと、

上記被検体に対する一つもしくは複数の受容体であって、フィコビルン蛋白質-結合ペプチド錯体によって形成された蛍光受容体化合物と結合しているものからなる第2の試薬を添加するステップと、

上記第1及び第2の試薬の夫々が添加された後、あるいは、上記第1及び第2の試薬の両者が添加された後の上記媒質をインキュベートするステップと、

インキュベートされた上記媒質を、上記蛍光供与体化合物についての励起波長を有した光によって励起するステップと、

上記蛍光受容体化合物が発する信号を測定するステップと、

を含んだ過剰方法から成ることを特徴とする請求項7記載の均質蛍光検出／定量方法。

9. 被検体が含まれていることが分かっている媒質中に、該被検体に対する受容

体であって、希土類クリプテート、キレートもしくは巨大環状錯体により形成された蛍光供与体化合物と結合しているものから成る、第1の試薬を添加するステップと、

フィコビリן蛋白質-結合ペプチド錯体によって形成された蛍光受容体化合物と結合した被検体からなる第2の試薬を添加するステップと、

上記第1及び第2の試薬の夫々が添加された後、あるいは、上記第1及び第2の試薬の両者が添加された後の上記媒質をインキュベートするステップと、

インキュベートされた上記媒質を、上記蛍光供与体化合物についての励起波長を有した光によって励起するステップと、

上記蛍光受容体化合物が発する信号を測定するステップと、
を含んだ競合方法から成ることを特徴とする請求項7記載の均質蛍光検出/定量方法。

10. 被検体が含まれていることが分かっている媒質中に、該被検体に対する受容体であって、フィコビリן蛋白質-結合ペプチド錯体によって形成された蛍光受容体化合物と結合しているものから成る、第1の試薬を添加するステップと、
希土類クリプテートもしくはキレートにより形成された蛍光供与体化合物と結合した被検体からなる第2の試薬を添加するステップと、

上記第1及び第2の試薬の夫々が添加された後、あるいは、上記第1及び第2の試薬の両者が添加された後の上記媒質をインキ

ュベートするステップと、

インキュベートされた上記媒質を、上記蛍光供与体化合物についての励起波長を有した光によって励起するステップと、
を含んだ競合方法から成ることを特徴とする請求項7記載の均質蛍光検出/定量方法。

11. 第1の試薬と第2の試薬とを、被検体が含まれていることが分かっている媒質中に、同時に添加することを特徴とする請求項7から請求項10までのいずれかに記載の均質蛍光検出/定量方法。

12. 蛍光供与体化合物もしくは蛍光受容体化合物のいずれかに結合した、被検

体に対する一つの受容体が使用されることを特徴とする請求項7または8記載の均質蛍光検出／定量方法。

13. 蛍光供与体化合物が、ユーロピウムもしくはテルビウムについてのキレート、クリプテートもしくは巨大環状錯体とされることを特徴とする請求項7から請求項12までのいずれかに記載の均質蛍光検出／定量方法。

14. 蛍光供与体化合物が、ユーロピウムもしくはテルビウムについてのキレート、クリプテートもしくは巨大環状錯体とされ、また、蛍光受容体化合物が、錯体:(α AP, β AP), LCとされることを特徴とする請求項7から請求項13までのいずれかに記載の均質蛍光検出／定量方法。

15. フィコビリן蛋白質-結合ペプチド錯体を、蛍光定量において蛍光供与体化合物として用いられる希土類クリプテートもしくはキレートから発せられる信号の増幅方法であって、蛍光受容体化合物が用いられるとともに、希土類クリプテートもしくはキレートが低い総量子収率を有すること、及び、希土類元素の発光レベルからの放射失活の量子収率が、上記フィコビリן蛋白質-結合ペプチド錯体から成る受容体の量子収率より低いことによって特徴付けられるものに用いることを特徴とする請求項1から請求項6のいずれかに記載のフィコビリן蛋白質-結合ペプチド錯体の蛍光トレーサとしての利用方法。

16. フィコビリן蛋白質-結合ペプチド錯体が、一つもしくは複数の異なる蛍光トレーサと共に用いられることを特徴とする請求項1から請求項6のいずれかに記載のフィコビリן蛋白質-結合ペプチド錯体の蛍光トレーサとしての利用方法。

17. 配位体と受容体との特定結合対の一方と共有結合したフィコビリן蛋白質-結合ペプチド錯体により形成されたことを特徴とする蛍光共役結合体。

18. フィコビリן蛋白質が、フィコエリトリン、フィコエリトロシアニン、フィコシアニン、アロフィコシアニン及びアロフィコシアニンB から選択されることを特徴とする請求項17記載の蛍光共役結合体。

19. 結合ペプチドが、ペプチド LR, LC, LRC及びLCMから選択されることを特

徴とする請求項17または18記載の蛍光共役結合体。

20. フィコビリן蛋白質-結合ペプチド錯体が、錯体：

(α PEC, β PEC), LR, (α PEC, β PEC), LR, (α PC, β PC), LR, (α PC, β PC), LRC, (α PC, β PC), LR, (α AP, β AP), LC, (α APB, α_2 AP, β_3 AP) LC及び(α AP, β AP), LCMから選択されることを特徴とする請求項17, 18または19記載の蛍光共役結合体。

21. フィコビリן蛋白質-結合ペプチド錯体が、Mastigocladus Laminosus, Synechocystis 6701, Synechococcus 6301, Anabaena variabilis and Nostoc spec. から選択されたラン藻類から抽出されることを特徴とする請求項17から請求項20までのいずれかに記載の蛍光共役結合体。

22. 配位体と受容体との特定結合対の一方が、受容体、特に、細胞受容体もしくは抗体とされることを特徴とする請求項17から請求項21までのいずれかに記載の蛍光共役結合体。

23. 配位体と受容体との特定結合対の一方が、配位体、特に、被検体とされることを特徴とする請求項17から請求項21までのいずれかに記載の蛍光共役結合体。

24. 請求項17から請求項23までのいずれかに記載された蛍光共役結合体を流動細胞計測法に用いることを特徴とする蛍光共役結合体の利用方法。

【発明の詳細な説明】

フィコビリן蛋白質-結合ペプチド錯体の蛍光トレーサ
としての利用方法

この発明は、フィコビリן蛋白質-結合ペプチド錯体の蛍光トレーサとしての利用方法、特に、測定媒質中に存在する可能性がある被検体(analyte)を蛍光を利用して検出および/または定量するにあたっての、フィコビリן蛋白質-結合ペプチド錯体の蛍光トレーサとしての利用方法に関し、さらに、配位体と受容体との特定結合対の一方と共有結合したフィコビリן蛋白質-結合ペプチド錯体により形成された蛍光共役結合体に関する。

生体液中の化合物についての定性分析及び定量分析に免疫学的定量手法を利用することが、現在良く知られている。現行の技術にあつては、蛍光定量法による定量がますます重要になってきている。実際に、蛍光定量法による定量には、高感度をもって迅速に行えること、蛍光化合物によって標識化された試薬が安定であつて無害であること、比較的低コストであること等の多くの利点がある。

フィコビリן蛋白質は、各種のバクテリア、藻類あるいはクリプト単細胞体のフィコビリソーム(集合体)の構成要素であり、一般に、フィコシアニン、フィコエリトリン、フィコエリトロシアニン及びアロフィコシアニンの4つのタイプがある。

また、フィコビリן蛋白質は、各々が1個もしくは複数の発

光団を有した α 及び β サブユニットによつて、ときには、さらに γ サブユニットを加えて成り、主として、三量体あるいは六量体として、分離して取り出される。それらのうちのいくつかは、それが有する量子収率、光吸収帯、安定性及び溶解能に関する利点に着目がなされて、蛍光標識化合物として利用される(V.Oi et al, J. Cell Biology 1982, 93, 981)。

概略的に述べれば、フィコビリן蛋白質は、アロフィコシアニンから成る筒状要素によつて形成されたコアと、フィコエリトリン及びフィコシアニンから成り、コアに固着された筒状要素によつて形成された筒状ロッドとの、2つの部分を含んでいる。筒状のロッドは、円盤状を成すフィコビリן蛋白質の集合によつて

形成されている。これらの円盤状を成すフィコビリן蛋白質は、ロッドからコアの間及びコアから結合ペプチドを介してチラコイド膜への中に集められている。

公表文献: Glazer, J. Biol. Chem., 1989, 264, 1-4によれば、これらのペプチドは、それらの局在化に従って名付けられており、ロッドにおける結合ペプチドはLRと命名され、コアにおける結合ペプチドはLCと命名され、ロッドとコアとの間における結合ペプチドはLRCと命名され、コアとチラコイド膜との間における結合ペプチドはLCMと命名されている。

従来方法によるフィコビリן蛋白質の精製は、結合ペプチドを欠いた三量体錯体($\alpha\beta$)、もしくは六量体錯体($\alpha\beta$)を得ることを可能にしている。三量体は、厚みが略30Åで径が略120Åの円盤状を成している。

蛍光定量法による免疫学的定量にあたって、フィコビリן蛋白

質、特に、アロフィコシアニン及びフィコエリトリンを用いることについては、ヨーロッパ特許第0 174 744号及び第0 076 695号、さらには、アメリカ合衆国特許第4,520,110号及び第4,542,104号に記載されている。

フィコビリゾームの精製中における特定の状態のもとで、フィコビリן蛋白質-結合ペプチド錯体が見出されることは、既に見出されている(P. Fuglistaller et al., Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 1987, 368, 353-367)。しかしながら、今までにあっては、フィコビリן蛋白質-結合ペプチド錯体は、蛋白質分解酵素に対して敏感であって比較的不安定なものとされている

(W. Reuter and C. Nickel-Reuter, J. Photochem. Photobiol., B: Biol., 1993, 18, 51-66)。

それに対して、此の度、フィコビリן蛋白質-結合ペプチド錯体が、フィコビリן蛋白質が蛍光トレーサとして使用できることを示す分光特性を有していることが見出された。

実際、フィコビリן蛋白質-結合ペプチド錯体は、フィコビリן蛋白質単体に比して、量子収率の増大、発光波長の変動、吸収光波長の変化、および/または、モル吸収係数の変化を伴う、フィコビリן蛋白質単体の分光特性とは異なる分光特性を常に示す。このような特性は、一つもしくは複数の蛍光トレーサを使用

する検出システムであって、媒質中のトレーサの安定性に加え、システムの検出下限に直接的な影響を及ぼす量子収率、及び、複数のトレーサが使用される場合に夫々に応じて設定される発光波長の二つのパラメータが取り分け重要とされるものの実行にあたって、極めて興味深い。

従前においては予期されなかったことであるが、今や、フィコビリן蛋白質-結合ペプチド錯体が、幾つかの異なった蛋白質分解酵素を含んだ各種の血清が存在するもとで安定な液状をなすこと、フィコビリן蛋白質-結合ペプチド錯体を、その蛍光特性を維持させたまま、各種の蛋白質及び抗体と共有結合させることができること、が明らかにされている。

この発明の特徴によれば、この発明において使用されるフィコビリן蛋白質は、フィコエリトリン、フィコエリトロシアニン、フィコシアニン、アロフィコシアニン及びアロフィコシアニン B のうちから選択される。

以下の記述においては、各フィコビリן蛋白質が下記の如くに省略記号が用いられてあらわされる。

アロフィコシアニンがAPをもってあらわされる。

フィコエリトリンがPEをもってあらわされる。

フィコエリトロシアニンがPECをもってあらわされる。

フィコシアニンがPCをもってあらわされる。

アロフィコシアニン B がAPBをもってあらわされる。

好ましくは、フィコビリן蛋白質-結合ペプチド錯体は、*Mastigocladus laminosus*, *Synechocystis* 6701, *Synechococcus* 6301, *Anabaena variabilis* and *Nostoc spec.* から選択されたラン藻類から抽出される。

この発明の目的のために用いられるフィコビリן蛋白質-結合ペプチド錯体における結合ペプチドは、好ましくは、前述の如くに定義されたペプチドLR, LC, LRC及びLCMのうちから選択される。

この発明に従って使用可能なフィコビリן蛋白質-結合ペプチド錯体は、上述の省略記号をもってあらわされたフィコビリן蛋白質、 α 及び β サブユニット、

及び、上述の結合ペプチドLR, LC, LRC及びLCMが用いられて、次のように定義される。

(α PBC, β PBC)₂LR, (α PBC, β PBC)₃LR, (α PC, β PC)₂LR, (α PC, β PC)₃LR, (α PC, β PC)₂LC, (α AP, β AP)₂LC, (α APB, α ₂AP, β ₃AP)₂LC及び(α AP, β AP)₂LCM

この発明に従えば、フィコビルン蛋白質-結合ペプチド錯体は、一つもしくは複数の異なる蛍光トレーサと共に用いられる場合もある。

この発明の目的に適った好ましいフィコビルン蛋白質-結合ペプチド錯体は、錯体: (α AP, β AP)₂LC、即ち、アロフィコシアニンによる α 及び β サブユニットの三量体及びコアにおける結合ペプチドにより形成されたフィコビルン蛋白質-結合ペプチド錯体である。ペプチドの長さは、種及び精製時における滅成プロセスに応じて変わり、好ましくは、5,000 から30,000の間である。

また、この発明の他の特徴によれば、この発明は、媒質中に存在する可能性がある被検体(analyte)を、被検体と少なくとも一つの対応受容体との間の反応による生成物を表示することによって検出および/または定量する均質蛍光検出/定量方法に関し、斯かる均質蛍光検出/定量方法は、

- 1) 被検体に対する少なくとも一つの受容体から成る第1の試薬を媒質中に添加するステップと、
- 2) 被検体もしくは被検体に対する少なくとも一つの受容体のうちから選択された第2の試薬を添加するステップとを、

第1及び第2の試薬のうち的一方が、希土類クリプテート、キレートもしくは巨大環状錯体から成る蛍光供与体化合物と結合しており、また、第1及び第2の試薬のうち他方が、蛍光受容体化合物と結合しているもとで、1)のステップと2)のステップとの順序については可逆としてとり、さらに、第1の試薬と第2の試薬とが添加された媒質を、蛍光供与体化合物についての励起波長を有した光によって励起した後、

- 3) 蛍光受容体化合物が発する信号を測定するステップをとり、

フィコビルン蛋白質-結合ペプチド錯体を蛍光受容体化合物として用いるこ

とを特徴とするものとされる。

この発明の記載においては、“被検体(analyte)”は、検出および／または定量の対象とされる物質もしくはそれに類似する物質の群を意味し、また、“受容体(receptor)”は、被検体の一部に特異的に結合することができる物質を意味し、さらに、“配位子(ligand)”は、受容体に特異的に結合することができる物質を意味する。

以下に記述される定量方法、過剰方法及び競合方法において用いられ得る希土類クリプテートは、ヨーロッパ特許出願第0 180 492号、第0 232 348号及び第0 321 353号、さらには、国際特許出願(PCT 出願)第W090/04791号に記載されている。また、N-oxy基を提供する希土類巨大環状化合物は、国際特許出願(PCT出願)第W093/05049号に記載されている。

これらの希土類クリプテート及び希土類巨大環状化合物は、含塩蛋白質液中において極めて安定であるという利点を有している。斯かる特性は、均質免疫定量法の場合において特に重要である。

この出願に記載された方法及び手順においては、N-oxy基を提供するテルビウムもしくはユーロピウム キレート、クリプテートあるいは巨大環状錯体が、蛍光供与体化合物として用いられることが望ましい。

この発明の特徴によれば、この発明に係る方法は過剰方法とされ、斯かる過剰方法は、

- 1) 被検体が含まれていることが分かっている媒質中に、被検体に対する少なくとも一つの受容体であって、希土類クリプテート、キレートもしくは巨大環状錯体により形成された蛍光供与体化合物と結合しているものから成る、第1の試薬を添加するステップと、
- 2) 被検体に対する一つもしくは複数の受容体であって、フィコビリן蛋白質-結合ペプチド錯体によって形成された蛍光受容体化合物と結合しているものからなる第2の試薬を添加するステップとを、
- 3) 第1及び第2の試薬の夫々が添加された後、あるいは、第1及び第2の試薬の両者が添加された後の媒質をインキュベートするステップと、

4) インキュベートされた媒質を、蛍光供与体化合物についての励起波長を有した光によって励起するステップと、

5) 蛍光受容体化合物が発する信号を測定するステップと、
から成るものとされる。

斯かる過剰方法にあつては、特に、蛍光供与体化合物もしくは蛍光受容体化合物のいずれかに結合した、被検体に対する一つの受容体の使用が可能とされる。

この発明の他の特徴によれば、この発明に係る方法は競合方法とされ、斯かる競合方法は、

1) 被検体が含まれていることが分かっている媒質中に、被検体に対する受容体であつて、希土類クリプテート、キレートもしくは巨大環状錯体により形成された蛍光供与体化合物と結合しているものから成る、第1の試薬を添加するステップと、

2) フィコピリン蛋白質-結合ペプチド錯体によって形成された蛍光受容体化合物と結合した被検体からなる第2の試薬を添加するステップとを、

3) 第1及び第2の試薬の夫々が添加された後、あるいは、第1及び第2の試薬の両者が添加された後の媒質をインキュベートするステップと、

4) インキュベートされた媒質を、蛍光供与体化合物についての励起波長を有した光によって励起するステップと、

5) 蛍光受容体化合物が発する信号を測定するステップと、
から成るものとされる。

さらに、この発明にあつては、前述の、媒質中に存在する可能性がある被検体を、被検体と少なくとも一つの対応受容体との間の反応による生成物を表示することによって検出および／または定量する均質蛍光検出／定量方法が、競合方法とされ、斯かる競合方法は、

1) 被検体が含まれていることが分かっている媒質中に、被検体に対する受容体であつて、フィコピリン蛋白質-結合ペプチド錯体によって形成された蛍光受容体化合物と結合しているものから成る、第1の試薬を添加するステップと、

- 2) 希土類クリプテートもしくはキレートにより形成された蛍光供与体化合物と結合した被検体からなる第2の試薬を添加するステップとを、
 - 3) 第1及び第2の試薬の夫々が添加された後、あるいは、第1及び第2の試薬の両者が添加された後の媒質をインキュベートするステップと、
 - 4) インキュベートされた媒質を、蛍光供与体化合物についての励起波長を有した光によって励起するステップと、
 - 5) 蛍光受容体化合物が発する信号を測定するステップと、
- から成るものとされる。

斯かる方法にあつては、第1の試薬と第2の試薬とを、同時に、被検体が含まれていることが分かっている媒質中に添加されることが好ましい。

この発明における格別の特徴によれば、上述のこの発明に係る方法において用いられる蛍光供与体化合物が、ユーロピウム(Eu^{3+})もしくはテルビウム(Tb^{3+})についてのキレート、クリプテートもしくは巨大環状錯体とされ、また、蛍光受容体化合物が、錯体： $(\alpha\text{AP}, \beta\text{AP})$, LC とされる。

この発明は、また、上述において定義された如くのフィコビリן蛋白質-結合ペプチド錯体の、それを蛍光定量において蛍光供与体化合物として用いられる希土類クリプテートもしくはキレートから発せられる信号の増幅方法に用いる使用方法に関する。斯かる増幅方法は、それにおいても蛍光受容体化合物が用いられるとともに、希土類クリプテートもしくはキレートが低い総量子収率を有すること、及び、希土類元素の発光レベルからの放射失活

の量子収率が、フィコビリן蛋白質-結合ペプチド錯体から成る受容体の量子収率より低いことによって特徴付けられる。

この発明は、さらに、配位体と受容体との特定結合対の一方と共有結合したフィコビリן蛋白質-結合ペプチド錯体により形成された蛍光共役結合体に関する。

斯かる共役結合体は、公表文献：Mel. N. Kronik, J. Immunological Methods, 1986, 92, 1-13に記載されている如くの流動細胞計測法において、細胞の分類および／または細胞表面の分析に用いられ得るものとされる。そして、蛋白質

と蛋白質との対、蛋白質とDNAとの対、もしくは、DNAとDNAとの対が、配位体と受容体との特定結合対の例として挙げられる。好ましくは、この発明において用いられるフィコビルン蛋白質が、フィコエリトリン、フィコエリトロシアニン、フィコシアニン、アロフィコシアニン及びアロフィコシアニン Bの中から選択されるとともに、結合ペプチドが、前述の如くに定義されたペプチド LR, LC, LRC及びLCMの中から選択される。

また、フィコビルン蛋白質-結合ペプチド錯体は、錯体：(α PEC, β PEC), LR, (α PEC, β PEC), LR, (α PC, β PC), LR, (α PC, β PC), LRC, (α PC, β PC), LR, (α AP, β AP), LC, (α APB, α , AP, β , AP) LC及び(α AP, β AP), LCMの中から選択され、錯体：(α AP, β AP), LC とされることが望ましい。

さらに、好ましくは、フィコビルン蛋白質-結合ペプチド錯体は、*Mastigocladus Laminosus*, *Synechocystis* 6701, *Synechococcus* 6301, *Anabaena variabilis* and *Nostoc spec.* から選択された

ラン藻類から抽出される。

この発明の目的のために用いられるフィコビルン蛋白質-結合ペプチド錯体における結合ペプチドは、好ましくは、前述の如くに定義されたペプチド LR, LC, LRC及びLCMのうちから選択される。

配位体と受容体との特定結合対の一方は、受容体、特に、細胞受容体もしくは抗体とされるのが望ましく、このような受容体として、例えば、アビジンもしくはストレプトアビジンが挙げられる。

さらに、配位体と受容体との特定結合対の一方が、配位体、特に、被検体とされる場合には、斯かる配位体として、例えば、ポリペプチド、レクチンもしくはビオチンが挙げられる。

実施例：癌胎児性抗原(CEA)の定量

モノクローナル抗体G12(フランスのCIS bio international製)に結合したユーロピウム クリプテート Eu トリスビビリジン ダイアミンが、ヨーロッパ特許出願321 353号の実施例3及び4に記載された如くに調製されて、供与体化合物として用いられるとともに、モノクローナル抗体G15(フランスのCIS bio i

nternational製)に結合したアロフィコシアニン(アメリカ合衆国のCyanotech製)もしくは錯体: (α AP, β AP), LCのいずれかが、受容体として用いられて、均質免疫定量分析が行われた。

以下の説明においては、下記の省略記号が用いられる。

AP : アロフィコシアニン

DTT : ジチオトレイトール

EuTB: ユーロピウム クリプテート Eu トリスビピリジン
ジアミン

BSA : 牛血清アルブミン

HSA : 人血清アルブミン

IgG : 免疫グロブリン G

SPDP: N-サクシニミジル 3 (2-ピリジルジチオ) プロピオネート

Sulpho-SMCC: スルフォサクシニミジル (4-n-マレイミドメチル)

シクロヘキサン

1) IgG G15 - AP 共役結合体の調製

a) Sulpho-SMCC によるAPの活性化

60%アンモニウム硫酸塩溶液中における沈殿物として市販されているAP(3mg)が遠心分離される。上澄液が除去された後、残留分が、pH7.0の100mM磷酸塩緩衝液250 μ lとともに取り出され、緩衝液中の懸濁粒子を除去すべく、0.8 μ mオーダーのフィルターを通じて濾過される。

濾過された緩衝液中のAPは、100mM磷酸塩緩衝液中に置かれた超精細カラムG25(スエーデンのPharmacia製)が用いられた排除クロマトグラフィによって精製される。それにより、溶出されるAPは、 ϵ 650nm; 731,000M⁻¹cm⁻¹が考慮されて、波長を650nmとする光の吸収度合に基づいて定量される。

APの活性化は、Sulpho-SMCCの溶液を、pH7.0の100mM磷酸塩緩衝液中に6.9mMが存在することになるように加えられ、室温のもとで1時間、穏やかに攪拌されるなかで反応が進行するようにされて行われる(APに対するSulpho-SMCCのモル比は15から75とされる)。そして、AP-マレイミドが、pH6.5で5mM

のEDTA (エチレンジアミン四酢酸) を含んだ100mM磷酸塩緩衝液中に置かれた超精細カラムG25が用いられて精製され、IgG 3D3との結合に先立って、4℃に保持される。

b) SPDPによるIgG G15の活性化

pH 7.0の100mM磷酸塩緩衝液中に10mg/mlの割合で混入された5mgのIgG G15が、SPDPの溶液 (アメリカ合衆国のPierce製) が、100mM磷酸塩緩衝液中に6.4mMが存在して、IgG G15に対するSPDPのモル比が7.5となるように加えられることによって活性化される。そして、室温のもとでの35分間に亘る活性化が行われた後、IgG ピリジン-2チオンが、pH 6.5で mMのEDTAを含んだ100mM磷酸塩緩衝液中に置かれた超精細カラムG25が用いられて精製される。

それにより、蛋白質が濃縮されるとともに、2-ピリジル ジサルファイド基が、最終的には19mMに濃縮されるDTTの溶液 (アメリカ合衆国のSigma製) によって、室温のもとで15分間還元される。DTTとピピリジン-2チオンとは、pH 6.5で5mMのEDTAを含んだ100mM磷酸塩緩衝液中に置かれた超精細カラムG25が用いられての精製により分離される。IgG-SHの濃度は、 ϵ 280nm; $210,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ のもとで、波長を280nmとする光の吸収度合に基づいて定量される。

c) IgG G15-SHとAP-マレイミドとの共役結合体

チオ基のマレイミドに対する結合が、IgG G15-SHにその1mg当たり2.51mgの活性化されたAPが加えられることによって行われる。IgG G15-SHにAPが加えられ、暗所において4℃のもとで穏やかに攪拌されつつ行われるインキュベーションが18時

間継続した後、自由状態のまま残されていたチオ基が、最終的には20mMに濃縮されるN-メチルマレイミド (アメリカ合衆国のSigma製) の100mM溶液が加えられて、室温のもとで1時間おかれることによりブロックされる。

その結果得られる反応媒質が、pH 7.0の100mM磷酸塩緩衝液中に置かれた準分離カラムTSK G3000SW (アメリカ合衆国のBeckmann製) が用いられて行われるゲル濾過によって精製される。最初のピークにおいて溶出される精製された共役

結合体中のAPの濃度及びIgG G15の濃度は、夫々、下記の等式に従って、波長を280nmとする光の吸収度合及び波長を650nmとする光の吸収度合に基づいて定量される。

$$[\text{AP}] \text{ Mole/l} = A_{650\text{nm}} / 10,000$$

$$[\text{IgG}] \text{ Mole/l} = (A_{280\text{nm}} - A'_{280\text{nm}}) / 210,000$$

ここで、 $A'_{280\text{nm}}$ は、AP-マレイミドの波長280nmの光に対する寄与度である。

このようにして得られる共役結合体にあつては、さらに、HSAが1 lあたり1 g添加され、その後、一定分割量を取り出されて、 -20°C のもとで冷凍される。

2) IgG G15 - (α AP, β AP) ,LC共役結合体の調製

a) Sulpho-SMCCによる錯体 : (α AP, β AP) ,LC の活性化

錯体 : (α AP, β AP) ,LC は、藻類 : *Mastigocladus Laminosus* から得られる。フィコビリゾームの抽出の後、蛋白質-結合ペプチド錯体が、文献 : P. Fuglistaller et al., Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 1986, 367, 601-614の記載に従って精製される。

錯体 : (α AP, β AP) ,LC は、次のような特性を具えている。

$$\epsilon_{650\text{nm}} = 1,076,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$D_{650\text{nm}} / D_{620\text{nm}} = 2.2$$

pH7.0の100mM磷酸塩緩衝液中に、1 ml 当たり 3 mg存在する錯体 : (α AP, β AP) ,LCの1 ml に、pH7.0の100mM磷酸塩緩衝液中に1 ml 当たり 30モル存在する Sulpho-SMCCの溶液の19.5 μ l が添加され、 30°C のもとで30分間のインキュベーションが行われる。そして、反応生成物が、1分間当たり 2 ml の流動率を有した G25 HRカラムが用いられて精製される。デッドボリュームにおいて溶出された留分は復活せしめられる ($V=1.7\text{ml}$)。マレイミド錯体 : (α AP, β AP) ,LCの濃度は、1 ml 当たり 1.4mg である。

b) SPDPによるIgG G15の活性化

斯かる活性化は、前期『1) IgG G15 - AP共役結合体の調製』における「b) SPDPによるIgG G15の活性化」に記載された如くに行われる。

c) IgG G15-SH とマレイミド錯体 : (α AP, β AP), LC との共役結合体

上述の『a) Sulpho-SMCCによる錯体 : (α AP, β AP), LCの活性化』において得られる溶液が、1 ml 当たり 0.9 mg の割合とされる IgG G15-SH の溶液との接触状態におかれる。

4℃のもとで一晩の間、ローラー攪拌器によって攪拌されるもとでのインキュベーションが行われた後、pH7.0の100mM磷酸塩緩衝液中に置かれた、1分間当たり 4 ml の流動率を有した準分離カラム TSK 4000 (アメリカ合衆国の Beckmann 製) が用いられて、精製される。48~64 ml 留分は、結合されて、AMICON コーンに集められる。1 ml 当たりの mg であらわされる錯体 : (α AP, β AP)

, LC の濃度は、式 : $D0650 / 10.76$ に従って求められる。

1 ml 当たりの mg であらわされる IgG の濃度は、下記の如くの式に従って求められる。

$$D0280 - (D0650 / (5.25 \times 1.4))$$

得られる共役結合体は、IgG が 1 ml 当たり 120μ l であるもとで、

$$1.6 \times \text{錯体 : } (\alpha \text{ AP, } \beta \text{ AP}), \text{LC} / \text{IgG : } D0650 / D0620 = 2.2$$

とされるモル比を有する。

3) IgG G12 - Eu TBP 共役結合体の調製

IgG G12-SH の調製は、上述の G15 3D3 の調製と同様に行われるが、但し、IgG G12 に対する SPDP のモル比は 4 から 16 に変えられる。

Eu TBP の 5 mg (5×10^{-6} モル) に、Eu TBP の 1 モルに対して活性化物質の 2.5 モルの割合となるように、ジメチルフォルマミド 10% を含み、pH7.0 の 20mM 磷酸塩緩衝液中に存在する Sulpho-SMCC の 25mM 溶液が添加される。

室温のもとで 45 分間の活性化が行われた後、反応生成物が、生じる可能性が高い沈殿物の除去のため、 0.8μ m オーダーのフィルターを通じて濾過される。不所望な反応生成物 (Sulpho-SMCC, N-ヒドロキシ-サクシンイミド, (N-マレイミドメチル) カルボン酸) は、ジメチルフォルマミド 10% を含み、塩化ナトリウム衝撃のもとで pH7.0 の 20mM 磷酸塩緩衝液中に置かれた MonoQ カラム (スエーデンの Pharmacia 製) が用いられて行われる、イオン交換クロマトグラフィ

によって除去される。Eu TBPマレイミドの濃度は、A280nmに対するA307nmの比とともに $\epsilon_{307nm}:25,0$

$00 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ が考慮されて、波長を307nmとする光の吸収度合に基づいて定量される。

前述と同様に、マレイミド基は、IgG G12-SHに対するEu TBPマレイミドのモル比が10から30に変化するもとで、抗体に結合したチオ基と反応する。

4℃のもとで18時間に亙るインキュベーションが行われ、チオ基（自由のまま残されたもの）がN-メチルマレイミドによってブロックされた後、未結合のEu TBPが、4℃のもとで、pH7.0の100mM磷酸塩緩衝液中における透析によって、無くなるまで取り除かれる（透析槽の中で蛍光を発しない）。

このようにして得られる共役結合体の特性は、A280nmに対するA307nmの比によって定量されたクリプテートの実際の光吸収量が考慮に入れられ、以下の値が用いられて、波長を307nmとする光の吸収度合及び波長を280nmとする光の吸収度合に基づいて定量される。

Eu TBPマレイミドについて：

- ・ $\epsilon_{307nm} = 25,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
- ・ A307nm/A280nm； 実験的に定量された値

IgG G12-SHについて：

- ・ $\epsilon_{280nm} = 210,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
- ・ A307nm = 0 $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

4) CEA定量の応用

G12-Eu TBP, G15-AP及びG15-錯体：(α AP, β AP)。LC共役結合体は、400mMのKF, 1 l 当たり 1 g の割合のBSAを含み、pH6の100mM磷酸塩緩衝液中において希釈される。

続いて、ポリスチレン製の極小板部材（アメリカ合衆国のDyna-tech製）において、下記のものゝ順次添加される。

- ・ 100 μ l の標準溶液（CEAを含まない血清）もしくは 100 μ l の試験済のサ

ンプル

・ 100 μ l の G12-Eu TBP 共役結合体 (1 ml 当たり 0.5 μ g)

・ 100 μ l の G15-AP 共役結合体 0 (1 ml 当たり 5 μ g もしくは 100 μ l の G15

-錯体: (α AP, β AP), LC 共役結合体。

37°C のもとで 3 時間に亙るインキュベーションが行われた後、以下において述べられるレーザ・プロトタイプ・蛍光定量器の助けを借りての読み出しが行われる。

窒素パルスレーザ (LASER SCIENCE INC, 製のモデル LS1-337ND) が、励起源として用いられる (波長は 337.1 nm)。パルス幅は 3 ns (3 ナノ秒) であって、パルス周波数は 10 Hz である。レーザ光ビームは、波長 337 nm を有する成分以外の寄生光を除去すべく、フィルタ (CORNING 製) を通過するものとされる。

レーザ光ビームは、測定室に入った後、紫外光を反射して、可視光を通過させる特性を有し、4.5 度の角度に配されたダイクロイック・ミラーによって反射される。ダイクロイック・ミラーによって反射されたレーザ光ビームは、熔融二酸化珪素により作られたレンズによって、極小板部材における測定壁上に集束せしめられる。発光蛍光は 20 度に選定された固定角に沿って集められ、レンズによって平行光線化されて、ダイクロイック・フィルタを直接的に通過する。

検出されるべき蛍光の波長に応じて特性が定められた干渉ミラーによって寄生光が除去され、蛍光の強度が光増幅器 (HAMAMATSU

製の R2949) によって測定される。

使用される光子カウンタは、SR-400 (STANFORD RESEARCH SYSTEMS 製) であって、その動作とレーザ光との同期状態は、IBM PC-AT 型のコンピュータにより、RS-232 出力ポートを介して制御される。

光増幅器から発せられるパルスは、光増幅器における雑音対信号比についての要求を緩和させるべく、光子カウンタによって設定される識別レベルを越えるものとされるべく定められた遅れ時間 (td) を持つものとされた後、所定のタイムウインドー (tg) において記録される。

IBM PC-AT 型のコンピュータにより操縦される X-Y テーブルは、ステッピング・

モータによって駆動されて、測定用極小板部材に、ローディング位置、励起光を受ける位置、96個のウェルについての読出しが順次自動的に行われるようにする位置等を含む様々な位置をとらせる。

G15-APあるいはG15-錯体： $(\alpha\text{AP}, \beta\text{AP})_3\text{LC}$ 共役結合体から発せられる蛍光は、波長665nmの光を通過させる波長幅10nmの通過波長帯域特性を示すとともに50 μS の時間遅れを生じさせるプロトタイプ蛍光定量装置の助けを得て測定される。

測定結果は、下記の表に示されるとおりである。この表において、 Δcps は、波長665nmの光により励起されたサンプルにより発せられる信号と標準溶液(CEAを含まない血清)により発せられる信号との差に相当している。

CEA ng/ml	AP Δcps	錯体： $(\alpha\text{AP}, \beta\text{AP})_3\text{LC}$ Δcps
4.4	251	388
15.9	966	1670
118	6427	9804
236	9436	16232

この表に示される測定結果から、フィコビリן蛋白質-結合ペプチド錯体から発せられる信号が、フィコビリן蛋白質単体から発せられる信号より大であるということが理解される。

さらに、フィコビリן蛋白質-結合ペプチド錯体を特徴付ける比： $D0650/D0620 = 2.2$ が、共役結合体の調製にあたっての各ステップにおいて、その変化が測定誤差の範囲内に抑えられることに着目されるべきであり、この比は、APについての対応する比(略 1.45)とは著しく異なっている。

このことは、フィコビリן蛋白質-結合ペプチド錯体が、各種の精製ステップを通じて安定であることを実証しており、フィコビリן蛋白質-結合ペプチド錯体との結合が、G15 AP共役結合体の場合とは異なり、不都合に対する格別な警戒あるいは予防策が要されることなく行われることになる。

【 国 際 調 査 報 告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. P./FR 96/00865		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 G01N33/533 G01N33/542 G01N33/58 C07K19/00 C07K14/195		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 G01N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US.A.4 857 474 (J.B. WATERBURY ET AL.) 15 August 1989 see the whole document -----	1-13, 15-24 14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 August 1996		Date of mailing of the international search report 19. 09. 96
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tlx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Van Bohemen, C

information on patent family members:

1-1/FR 96/00865

Patent document cited in search report.	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A-4857474	15-08-89	NONE	

フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁶

識別記号

F I

C 0 9 K 11/06

C 0 9 K 11/06

G 0 1 N 33/533

G 0 1 N 33/533

33/542

33/542

A

33/566

33/566

// C 0 7 K 19/00

C 0 7 K 19/00